

Eredmények

- Részletes elemzést készítettünk a patkány béta ösztrogén receptort (ER- β) tartalmazó oxitocin és vazopresszin idegsejtjeinek topográfiai megoszlásáról. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a hipotalamusz paraventrikuláris és supraoptikus magjainak magnocelluláris neuronjai közül az ER- β a VP idegsejtekben fordul nagyobb mennyiségben elő, és azok 80%-ában megjelenik. A legmagasabb ER- β expressziós szintet azonban az agytörzsi és gerincvelői vetületekkel rendelkező oxitocin idegsejtek „pml” almagon belüli csoportjában észleltük. A megfigyeléseket egy általunk kidolgozott, hármaskörű *in situ* hibridizációs módszerrel is megerősítettük. Ezen túl, ugyancsak *in situ* hibridizációval sikerült igazolni alacsony szintű ER- β mRNS expresszió jelenlétét a paraventrikuláris mag hipofiziotróf corticotropin-releasing hormon neuronjainak egy csoportjában is. A patkányban tett megfigyelések emberi relevanciáját poszt-mortem emberi agyszöveti mintákból származó metszetek immuncitokémiai vizsgálatával tanulmányoztuk. Kimutattuk az ER- β immunreaktivitás megjelenését emberi magnocelluláris neuronokban is, és kettős-jelölést végezve, mind oxitocin mind vazopresszin idegsejtekben észleltük a receptor jelenlétét. Immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a paraventrikuláris mag ER- β immunreaktivitását nagyrészt nukleáris lokalizációjú ER- β okozza, de a receptor kisebb mennyiségben extranukleárisan is megjelent kis- és nagysejtes neuroszekretoros idegsejtekben.
- Egérben vizsgáltuk a perifériás ösztrogén- és metabolikus szignálokat integráló és azokat LHRH idegsejtekhez közvetítő neuronrendszereket, köztük az ER- α -t és ER- β -t egyaránt expresszáló arcuatus idegmag idegsejtjeit. Kémiai magléziót alkalmazva, továbbá immun-fluoreszcens minták konfokális mikroszkópos elemzésével is igazoltuk, hogy az egér LHRH idegsejtjeinek neuropeptid Y (NPY) beidegzése 50%-ban az arcuatus magból származik. Ezen idegrostok egyúttal AGRP peptidet is tartalmaztak, és az arcuatus mag neonatális monosodium glutamát kezeléssel előidézett roncsolását követően a metszetekből nem voltak kimutathatóak. Az NPY afferensek egy további jelentős csoportjában (25%) - agytörzsi eredetre utaló - dopamin β hidroxiláz (az agytörzsi noradrenerg rendszer marker enzimje) jelenlétét mutattuk ki. Végül az afferensek mintegy egynegyedének eredete ismeretlen maradt.
- Igazoltuk a galanin szerepét a pajzsmirigyműködést irányító, hipofizeotróf thyrotropin-releasing hormon (TRH) idegsejtek afferens szabályozásában. Megállapítottuk ugyanakkor, hogy az arcuatus mag „GALP” termelő neuronjai a TRH neuronok beidegzéséhez jelentősen nem járulnak hozzá.
- Új, a korábbiaknál érzékenyebb *in situ* hibridizációs metodikát fejlesztettünk ki. A módszer a hibridizációs puffer összetételének módosításával (emelt dithiothreitol tartalom) a korábbinál sokkalta kisebb autoradiográfias háttér elérését teszi lehetővé. Ugyanakkor, a cRNS hibridizációs próba és a dextrán szulfát hibridizációs oldaton belüli koncentrációjának emelésével a jelerősség is jelentősen növelhető volt. A módszert később számos kolokalizációs hibridizációs vizsgálatban alkalmaztuk sikerrel, digoxigeninnel és radioizotóppal megjelölt próbákat kombinációban alkalmazva. Ezzel az érzékenyített módszerrel igazoltuk

a glutamaterg rendszer marker enzimjének (VGLUT2) jelenlétét is különféle neuroendokrin szekretoros rendszerekben.

- Patkány és egér kettősen-immunjelölt preoptikus metszeteinek összehasonlító elemzésével fajok közti különbséget tártunk fel az LHRH idegsejtek ER- β tartalmában. Míg patkányban az LHRH neuronok több mint 80%-ának magjában látható volt az ER- β immunjel, az egér ER- β c-terminális szakasza ellen gyártott ugyanazon immunsavóval egérben az LHRH sejtek magja jelöletlen maradt. Ezzel szemben, az LHRH sejtek kis százaléka egérben extranukleáris lokalizációban mutatott ER- β immunreaktivitást. Az extranukleáris jel a klasszikus magreceptor működésétől eltérő mechanizmusra utal.
- *In situ* hibridizációval megmutattuk, hogy a reprodukciót szabályozó LHRH neuronok 99%-ában expresszálódik a 2. típusú vezikuláris glutamát transzportert (VGLUT2) kódoló mRNS, mely a hipotalamikus glutamaterg rendszer marker enzimje. Konfokális mikroszkóppal a VGLUT2 immunreaktivitás is megjeleníthető volt az eminentia mediana-ban végződő LHRH terminálisok egy részében. Az adatok együttesen a felnőttkori LHRH idegsejtek glutamaterg fenotípusát igazolták, szemben a sejtekre prenatálisan jellemző, mások által korábban megfigyelt GABA-erg másodlagos fenotípusra.
- Ugyancsak kettős-*in situ* hibridizációs valamint kettős-immuncitokémiai megközelítések használatával bizonyítottuk, hogy a paraventriculáris mag thyrotropin-releasing hormon és corticotropin-releasing hormon szekretáló idegsejtjei is glutamatergek. Ezzel szemben, a thalamus reticularis magjában vagy az elülső hypothalamikus area-ban található proTRH neuronok és a centrális amygdalában előforduló CRH neuronok nem tartalmazták a VGLUT2 mRNS-t, GABA-erg fenotípust valószínűsítve.
- További neuroszekretoros rendszerek klasszikus neurotranszmitter tartalmát elemezve, igazoltuk, hogy nem minden releasing hormon rendszerre jellemző a glutamaterg fenotípus. Így, kimutattuk, hogy a - növekedést serkentő - growth hormone-releasing hormon (GHRH) idegsejtek GABA-ergek. Érdekes módon, a növekedési hormon termelését gátló, hipofiziotróp szomatosztatin idegsejtek viszont éppen a serkentő aminosav neurotranszmitter, glutamátot tartalmazták.
- Azonosítottuk a meztelen vakondpatkány LHRH-ját kódoló cDNS szekvenciáját. Megállapítottuk annak nagyfokú homológiáját a tengerimalac cDNS-ével. Míg azonban az előbbi faj cDNS-éről a legtöbb emlősben előforduló LHRH keletkezik, a tengerimalacra teljesen egyedi decapeptid szekvencia jellemző.
- Fénymikroszkópos megfigyeléseink alapján, leírtuk a tuberomammilaris magok és a bazális előagy kolinerg sejtjeinek idegi összeköttetéseit. További vizsgálatok vannak folyamatban szinapszisok elektronmikroszkópos azonosítására valamint H1 ill. H2 receptorok *in situ* hibridizációs kimutatására a beidegzett idegelemekben.
- Az emberi agy tuberális magjának neuropeptid Y (NPY) és proopiomelanokortin termelő idegsejt rendszerei között kétirányú morfológiai kapcsolatot mutattunk ki. Ezzel szemben, patkányban a kapcsolat aszimmetrikus, és POMC neuronok csupán kis mértékben vesznek részt az arcuatus mag NPY sejtjeinek innervációjában.

- Kongresszuson mutattuk be azon, *in situ* hibridizációs vizsgálatsorozattal nyert eredményeinket, melyek szerint a preoptikus area LHRH idegsejtekkel kapcsolatban álló GABA-erg interneuronjainak egyes alcsoportjai neurotenzint, míg mások P anyagot vagy galanint tartalmaznak. További neuropeptidek azonosítása az LHRH neuronok legfontosabb beidegzését adó GABA-erg interneuronokban folyamatban van. Az előzetes eredményekből olyan összefoglaló munka közlését tervezzük, melyben a GABA/neuropeptid kolokalizáció általánosabb összefüggéseit is le kívánjuk írni. Jelenleg olyan neuropeptid/GABA rendszerek azonosítása folyik, melyek - ösztrogén receptor tartalmuk révén - részt vehetnek a negatív és pozitív ösztrogén visszacsatolás folyamataiban.
- Kimutattuk, hogy a paraventrikuláris és szupraoptikus hipotalamusz magok magnocelluláris oxitocin és vazopresszin termelő idegsejtjei egyaránt expresszálják a 2. típusú vezikuláris glutamát transzportert. Sóterhelés (2% sóoldat itatása 7 napig) hatására a VGLUT2 mRNS expressziós szintje a vazopresszin idegsejtekben, csakúgy mint a kódolt VGLUT2 fehérje immuncitokémiával kimutatható mennyisége a hátsó hipofízis területén jelentősen megemelkedett. A vizsgálatok során általánosan használható módszert fejlesztettünk ki és alkalmaztunk azonosított fenotípusú (vazopresszin mRNS tartalmú) idegsejtek mRNS tartalmának (VGLUT2 mRNS) kvantitatív elemzésére. A megközelítés fluoreszcens és autoradiográfiás jel komponenseket használt, melyek kombinációja révén az autoradiográfiás jel interferencia-mentes kvantitatív képanalízise kivitelezhető vált.
- A retrográd pályajelölő anyag, Fluoro-Gold perifériás keringésbe juttatását követően, annak immunfluoreszcens kimutatását a VGLUT2 mRNS *in situ* hibridizációs megjelenítésével ötvöztük. Ezáltal feltérképeztük mindazon glutamaterg, és egyúttal neuroendokrin funkciójú idegsejtek perikaryonjának elhelyezkedését, melyek vér-agy gát-mentes területre, így az eminentia mediana és a hátsó hypophysis területére vetülnek. Megállapítottuk, hogy ilyen idegsejtek nagy számmal fordulnak elő a paraventrikuláris, szupraoptikus és periventrikuláris hipotalamusz magokban, de megjelennek az organum vasculosum laminae terminalis területén is. Evvel ellentétben, az arcuatus idegmag Fluoro-Goldot akkumuláló neuroendokrin sejtjei VGLUT2 expressziót nem mutattak, összhangban a neuronok GABA-erg jellegére utaló, korábbi megfigyelésekkel. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kiderítettük, hogy a VGLUT2 a hátsó hypophysis lebenyben és az eminentia mediana külső zónájában végződő neuroendokrin terminálisokban is szinaptikus vezikulákkal asszociáltan fordul elő, míg a neuropeptid tartalom (release és release-inhibiting hormonok) dense-core vezikulákkal asszociált. A VGLUT2 immunreaktív szinaptikus vezikulák dúsulása leginkább a perikapilláris térségek közelében volt jellemző.
- Előadásban, kongresszusi poszteren és minireview cikkben foglaltuk össze az elmúlt három évben szerzett ismereteinket a neuroszekretoros rendszerek többségének glutamaterg (VGLUT2) fenotípusáról.
- *In situ* hibridizációs térképezéssel megállapítottuk, hogy az agresszív viselkedésben szerepet játszó hipotalamikus támadási zóna idegsejtjei főképp glutamatergek (VGLUT 2 mRNS tartalmúak), és csupán igen kis hányaduk gátló

jellegű, GABA-erg. Neurokémiaiilag pontosabban is jellemeztük a glutamaterg idegsejtek domináns fenotípusát, azok thyrotropin-releasing hormon mRNS tartalma alapján. A vizsgálatsorozat az agresszív magatartás kiváltásában szerepet játszó terület idegsejtjeinek első neurokémiai jellemzését adta.

- *In situ* hibridizációval és immuncitokémiával kimutattuk, hogy a hipotalamusz egyes neuroendokrin idegsejtjein kívül az adenohypophysis bizonyos hámsejtjei is VGLUT2 fenotípusúak. Megállapítottuk, hogy ezen sejtek a gonadotrófok és a thyrotrófok. Ovariectomizált nőstény patkányok ösztrogén szubsztitúciója az adenohipofízis VGLUT2 mRNS expressziójának emelkedését okozta. Hím patkányokban a hypothyreózis ugyancsak látványosan megnövelte a VGLUT2 mRNS expresszióját.
- Érzékenyített immuncitokémiai módszert alkalmazva, az emberi hypothalamus LHRH idegsejtjeiben kimutattuk az ER- β immunreaktivitás jelenlétét. A kettős-jelölt neuronok topográfiai megoszlása nem mutatott regionális preferenciát. A nukleáris jel a neuronok 20-30%-ában jelen volt, és kimutathatósága megerősítette azt az elképzelést, hogy az ER- β receptor altípus szelektív jelenléte LHRH idegsejtekben emlősökben általános lehet. Az észleletekből készített átdolgozott kézirat bírálattal áll a J. Clin. Endocrinol. Metab. című folyóiratban.
- Immuncitokémiát használva, leírtuk az emberi hipotalamusz ghrelin immunreaktív idegrostjainak megoszlását és jellemeztük az egyes idegmagvak ghrelin beidegzésének sűrűségét.
- Szintén immuncitokémiai módszer és egy új antitest alkalmazását követően, részletes térképet készítettünk az egér hipotalamuszában CB1 kannabinoid receptort tartalmazó idegi elemekről. A receptort ultrastrukturális vizsgálataink gátló és serkentő idegvégződés preterminális szakaszaiban mutatták ki. Az új antitest használata által biztosított nagy detektálási érzékenység elsőként tette lehetővé, hogy a hipotalamusz viszonylag kevés receptort szintetizáló CB1 rendszerét megjeleníthessük. Az eredményeket a J. Comp. Neurol. C. Folyóirat közlésre elfogadta. A vizsgálatok folytatásaként, jelenleg az intrahypothalamikus CB1 receptor rendszer feltérképezését végezzük. CB1 receptor mRNS a hypothalamus számos neuronrendszerében termelődik, és különösen bőven van jelen a ventromedialis idegmagban. Az *in situ* hibridizációs eredmények közlése folyamatban van.
- A tavalyi évben beszereztünk kereskedelmi forrásból és gyógyszergyárral kollaborációban a szintetizált ER-beta-specifikus receptor agonista szereket *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokhoz. A szerekek megtörtént *in vitro* transzfekciók beállítása és promoter assay optimalizálása ER- α és ER- β expressziós vektorokkal transzfektált GT1-7 sejteken.
- Sajnos az ER- β ligand-független hatását az LHRH gén promoterén Pak és mtsai (Endocrinology. 2006 Apr;147(4):1924-31) előttünk már bemutatták. Korábbi hipotézisünkkel összhangban, a munkacsoport azt is megmutatta, hogy ER- β -n kifejtett hatásán keresztül az ösztrogén a ligand-független transz-aktivációt gátolni képes.
- A pályázatban munkatervében ER- β szelektív ligandumok használatára épülő *in vivo* vizsgálatokat is terveztünk. Noha sikerült beszereznünk mind ER- α -, mind ER- β -szelektív szteroid és heterociklusos vegyületeket, a szerek reprodukcióra

gyakorolt hatásának vizsgálatát nagyban nehezíti az a körülmény, hogy az ER- β szelektív ligandumok agyi bejutásának valamint genomikus hatásának nincs sem jelenleg elfogadott sem általunk azonosított molekuláris jele. Elővizsgálatainkban ugyan már meghatároztuk az ER- β -szelektív szteroid („8V-E2”) és heterociklusos („DPN”) agonista szerek azon dózisait, melyek szubkután és intravénás adás mellett nem okoztak (ER- α -mediált) uterotrop hatást, az ER- β -n keresztül kifejtett hatásra genomikus markert ezidáig még nem sikerült azonosítanunk (sem irodalomban találnunk). Ez a körülmény a tervezett *in vivo* vizsgálatokat (az ER- β -szelektív *in vivo* hatások azonosítása) késlelteti. A jelenleg is folyó előkísérletekkel a ligand által biztosan elért adenohipofízis galanin mRNS expressziójára gyakorolt ösztrogén hatást vizsgáltuk ovariectomizált állatokban. Megállapítottuk, hogy a galanin régóta ismert, ösztrogén általi indukcióját az adenohipofízisben ER- α közvetíti, ugyanakkor ER- β -n keresztül a galanin gén expressziója nem szabályozódik. Jelenleg microarray módszerrel és real-time PCR megközelítéssel próbálunk olyan ER- β -függő, agyi génexpresszió változásokat azonosítani, melyek az ER- β reprodukcióra gyakorolt *in vivo* hatásának értékeléséhez nélkülözhetetlenek lesznek.